 doi 10.3969/j.issn.1673-4254.2015.02.29 J South Med Univ, 2015, 35(2): 292-294

基础研究

pcDNA3.1-mTOR质粒体外转染对乳腺癌细胞生长的影响

刘民锋,郭昭泽,董建宇,杨翼鹏,嵇 健,刘润奇,延 艳,叶长生
南方医科大学南方医院乳腺科,广东 广州 510515

摘要:目的 研究信号转导通路mTOR体外对乳腺癌MCF-7细胞生长的抑制作用,及对抑癌基因PTEN的负反馈调节的影响。**方法** 用pcDNA3.1-mTOR真核表达质粒及空载质粒转染MCF-7;Western blot检测转染后mTOR蛋白的表达;流式细胞技术检测细胞周期和细胞凋亡情况;检测转染后PTEN蛋白的表达。**结果** 转染组细胞的生长速度明显增快,而未转染组和转染空载体质粒组无明显变化。转染mTOR基因后,PTEN 蛋白的表达明显下降。**结论** mTOR可能通过PI3K/AKT/PTEN与mTOR信号转导通路负反馈调节PTEN的表达。mTOR的增高可促进乳腺癌细胞的生长,为mTOR的特异性的抑制剂的运用提供了理论证据。

关键词:mTOR;信号转导通路;乳腺癌

Effect of mTOR plasmid transfection on growth of breast cancer MCF-7 cells *in vitro*

LIU Minfeng, GUO Zhaozhe, DONG Jianyu, YANG Yipeng, JI Jian, LIU Runqi, YAN Yan, YE Changshen
Department of Breast, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of mTOR signal transduction pathway and down-regulating anti-oncogene PTEN on the growth of breast cancer MCF-7 cells. **Methods** MCF-7 cells were transfected with the eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-mTOR and non-loaded plasmid, and the expression of mTOR in the cells was detected using Western blotting. Flow cytometry was used to analyze apoptosis and cell cycle of the transfected cells, and the expression of PTEN was detected after transfection. **Results** The cells transfected with pcDNA3.1-mTOR showed a increased growth rate than those transfected with the non-loaded plasmid and those without transfection. The expression of the protein PTEN decreased obviously in the cells after mTOR trasnfection. **Conclusion** mTOR can regulate the expression of PTEN via PI3K/AKT/PTEN pathways through a negative feedback mechanism. Increased mTOR expression promotes MCF-7 cell growth, suggesting the potential value of mTOR specific inhibitor in the treatment of breast cancer.

Key words: mTOR; signal transduction pathway; breast cancer cells

肿瘤的发生和发展是个多因素多步骤的过程,而各个因素之间的相互作用是通过不同的信号转导通路来实现的。体内外的各种刺激均会激活细胞内不同的信号转导通路,其中PI3K/AKT/mTOR是与细胞增殖和细胞凋亡关系最密切的信号转导通路之一,也是参与乳腺癌发展的重要信号转导通路[1-2]。而在这条信号转导通路中,mTOR作为一种具有丝/苏氨酸激酶活性的磷脂酰肌醇激酶相关蛋白激酶家族中的一种蛋白,与细胞的生长,细胞周期的调节,细胞的凋亡有密切的关系[3],与蛋白的转录与翻译关系密切[4-5]。在该信号转导通路中起重要调节作用,最终调控细胞周期和细胞凋亡。本研究通过脂质体介导转染pcDNA3.1-mTOR导入人乳腺癌MCF-7细胞中,观察转染后mTOR蛋白,磷酸化AKT,PTEN表达的变化;以及它们对MCF-7细胞生长作用的影响,从而探讨PI3K/AKT/mTOR信号转导通路中,mTOR蛋白的变化对乳腺癌细胞的影响及对该条信号转导通路中AKT和PTEN的负反馈作用。

收稿日期:2014-06-22
基金项目:广东省科技计划项目(2012B010300013)
作者简介:刘民锋,博士,主治医师,E-mail: matthewliu007@163.com;郭昭泽,在读硕士研究生,住院医师,E-mail: guozhz@mail.nfyy.com。刘民锋、郭昭泽共同为第一作者
通信作者:叶长生,教授,博士导师,E-mail: yechsh2006@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

细胞由人乳腺癌细胞株MCF-7购自上海麦莎生物有限公司。质粒与菌株pcDNA3.1-mTOR为本人制备,DH5α由实验室保存。兔抗磷酸化AKT(p-FAK,Ser-473)单克隆抗体、兔抗mTOR多克隆抗体及兔抗mTOR多克隆抗体均为Abcam产品,深圳晶美公司代理。Lipofectamine2000脂质体转染试剂盒购自美国Invitrogen,质粒大提试剂盒为Qiagen产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 乳腺癌细胞在10% FBS(胎牛血清)的培养基中种植,37 ℃,5% CO_2饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 脂质体介导转染细胞 通过脂质体介导把DNA转染入悬浮或贴壁细胞中。分离稳定转染体:在完全培

养基中孵育48~72 h后,用胰酶消化细胞并用合适的选择培养基重铺细胞。每2~4 d更换培养基,持续培养2~3周。

1.2.3 质粒的鉴定和扩增 质粒pcDNA3.1 -mTOR及空载质粒转化感受态细胞DH5α,37 ℃培养24 h;挑选阳性克隆,培养90 min提取质粒;限制性内切酶*Hin*dⅢ和*Xba* Ⅰ,酶切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定;扩增质粒并提取纯化。

1.2.4 mTOR基因过表达的检测 PCR检测mTOR的表达。

1.2.5 Western blot(免疫印迹) 转染48 h后,收集细胞,提取总蛋白进行电泳,转膜,一抗4 ℃过夜,二抗室温2 h,增强化学发光法(ECL)显影。

1.2.6 细胞生长 细胞转染后接种于6孔板培养,隔日换培养基。每种细胞7个孔。每日取1种细胞1孔进行计数,连续观察7 d。绘制细胞生长曲线。

1.2.7 细胞凋亡分析 收集转染后48 h的各实验组及对照组细胞,冷磷酸缓冲液洗涤2遍,1 ml 70%冷乙醇固定过夜处理,碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪检测凋亡率和细胞周期。ModFit软件分析。

1.3 统计学分析处理

SPSS19.0进行*t*检验和相关性分析。

2 结果

2.1 质粒转染后表达质粒的鉴定

pcDNA3.1-mTOR,空载质粒及脂质体转染细胞后,PCR鉴定转染成功(图1)。

2.2 转染后对MCF-7细胞生长的影响

转染mTOR,空载质粒及未转染组细胞生长图见图2,从图2明显可见转染野生型mTOR组细胞的生长可速度明显增快,而未转染组和转染空载体质粒组增快变化不显著。

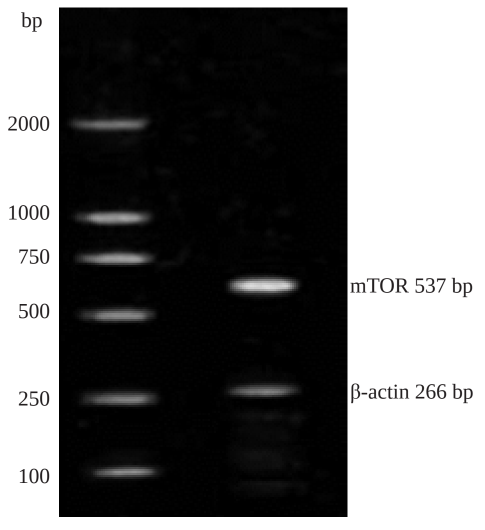


图1 转染后PCR鉴定图

Fig.1 PCR for verification of mTOR transfection in the cells.

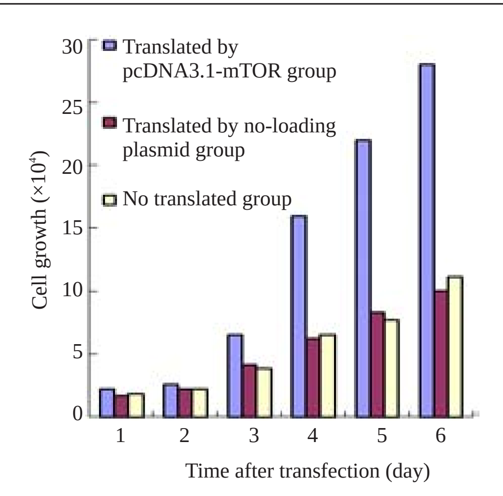


图2 三组细胞生长图

Fig.2 Cell growth in the 3 groups after transfection.

2.3 转染后mTOR蛋白的表达

转染mTOR基因后,其表达明显升高,与转染空质粒后有明显差异;转染mTOR后,AKT也随之表达增加而PTEN的表达明显下降,与其他2组有明显差异(图3)。

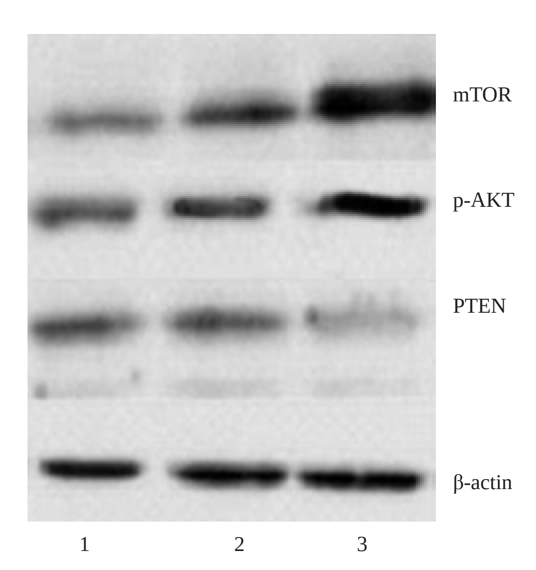


图3 转染后mTOR,AKT及PTEN蛋白的表达图

Fig.3 Expression of the mTOR, AKT, and PTEN proteins in the cells after transfection. Lane 1: Non-transfected cells; Lane 2: Cells transfected with the non-loaded plasmid; Lane 3: Cells transfected with pcDNA3.1-mTOR.

2.4 细胞周期和细胞凋亡情况

流式细胞术检测可见,mTOR转染组的细胞凋亡率达(8.2±1.3)%,与对照组相比明显升高($P<0.01$)。转染空质粒组的细胞凋亡率(4.3±0.8)%,与对照组相比变化不显著(表1)。

3 讨论

mTOR信号转导通路在调节细胞的凋亡、增生、分化等活动中起着重要作用,与恶性肿瘤的发生、发展关

表1 转染前后流式细胞检测比较

Tab.1 Cell cycle distribution and cell apoptosis of the cells in the 3 groups detected by flow cytometry

	G_1	S	G_2/M	AP
pcDNA3.1-mTOR	52.2±6.7	31.2±3.2	16.6±1.9	8.2±1.3
pcDNA3.1	60.3±5.6	21.4±4.3	15.3±4.7	4.3±0.8
MCF-7	65.4±4.8	19.4±3.8	14.6±2.1	3.4±1.1

系密切。mTOR信号转导通路与PI3K/AKT信号转导通路的密切的关系越来越受到重视。AKT的磷酸化使mTOR活化,使P70S6K、4E-BP1活化,4E-BP1磷酸化后失活,使之与eIF-4E分离,并与其他翻译起始因子结合,启动蛋白质的合成[1-2, 6]。

本研究将携带有mTOR的质粒导入MCF-7细胞中,发现细胞的mTOR蛋白的表达增强,磷酸化AKT的表达明显增强;而转染未携带有mTOR质粒的MCF-7细胞mTOR的表达不增强, AKT的表达也无明显改变。说明mTOR对PI3K/AKT/mTOR信号转导通路具有明显的负反馈作用。转染前后肿瘤细胞的凋亡率有显著意义的改变也提示mTOR可促进肿瘤细胞的生长。此结果与国内外的的报道一致[7-8]。而转染前后PTEN蛋白相应的改变说明,mTOR与PTEN呈明显负相关。有文献说明,AKT的活化直接磷酸化mTOR使之活化后作用于下游与翻译有关的P70S6K,EIF4E及翻译抑制蛋白4E-BPs,并能直接磷酸化PTEN,激活蛋白的转录,从而在转录水平和翻译水平上对肿瘤细胞的蛋白进行调节[9-10]。甚而有研究发现,mTOR的特异性抑制剂可以促进PTEN蛋白的表达,从而抑制肿瘤地增长[11-12]。

本试验对抑癌基因PTEN和基因mTOR表达的相关性研究,进一步证明PTEN作为一种重要的抑癌基因,在体外对乳腺癌细胞有重要的影响。 其主要的作用机制,可能通过PI3K/AKT/mTOR信号转导通路,调控mTOR的表达,利用mTOR对蛋白转录和翻译的重要调控作用,影响乳腺癌细胞的生长;也说明,mTOR对PTEN具有负反馈的调节作用。这个结果提高了我们对呈网络状的信号转导通路相互作用的认识,为寻找肿瘤细胞药物治疗的靶点提供了理论基础;也为mTOR特异性的抑制剂在乳腺癌治疗中的作用提供了理论基础。

参考文献:

[1] Lu J, Sun D, Gao S, et al. Cyclovirobuxin D induces Autophagy-Associated cell death via the Akt/mTOR pathway in MCF-7 human breast cancer cells[J]. J pharmacol Sci, 2014, 125(1): 74-82.

[2] Eva Madrid. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in estrogen receptor-positive breast cancer[J]. Cancer Treat Rev, 2014, 14: 44-7.

[3] Jensen PB, Hunter T, Shah SA, et al. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation[J]. J Surg Res, 2001, 97: 123-30.

[4] Cantrell DA. Phosphoinositide3-kinase signalling pathways[J]. J Cell Sci, 2001, 114: 1439-45.

[5] Testa JR, Bellacosa A. Akt plays a central role in tumori-genesis[J]. PNAS, 2001, 98: 10983-5.

[6] Mills GB, Lu YL, Kohn EC. Linking molecular therapeutics to molecular diagnostics: Inhibition of the FRAP/RAFT/TOR component of the PI3K pathway preferentially blocks PTEN mutant cells in vitro and *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(18): 10031-3.

[7] Grewe M, Gansauge F, Schmid RM, et al. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70 (s6K) pathway in human pancreatic Cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(15): 3581-7.

[8] Huang S, Liu LN, Hosoi H, et al. P53/p21cip1 cooperate in enforcing rapamycin induced G1 arrest and determine the cellular response to rapamycin[J]. Cancer Res, 2001, 61: 3373-81.

[9] Kawasaki K, Smith RJ, Hsieh CM, et al. Activation of the phosphatidylinositol3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxideinducedendothelial cell migration and angiogenesis[J]. Mol Cell Biol, 2003, 23: 5726-37.

[10] Debnath J, Walker SJ, Brugge JS. Akt activation disrupts mammary acinar architecture and enhance sproliferation in an mTOR-dependent manner[J]. J Cell Biol, 2003, 163: 315－26.

[11] Zeng ZZ, Yellaturu CR, Neeli I, et al. 5(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates DNA synthesisin human microvascular endothelial cells via activationof Jak/STAT and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling, leading to induction of expression of basic fibroblast growth factor[J]. J Biol Chem, 2002, 277: 41213-9.

[12] Nagata D, Mogi M, Walsh K. AMP-activated proteinkinase(AMPK) signaling in endothelial cells is essential for angiogenesis in response to hypoxic stress[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 31000-6.

（编辑:孙昌朋）